

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-223945

(43)Date of publication of application : 22.08.1995

(51)Int.Cl.

A61K 31/35
A61K 31/35
// C07D493/10

(21)Application number : 06-037586

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 10.02.1994

(72)Inventor : TSUDA HIDEYORI
MOCHIZUKI SHINICHI
TAKAHASHI HIDETOSHI
TOO KANJI
ISE MASAJI
YOSHIHAMA MAKOTO

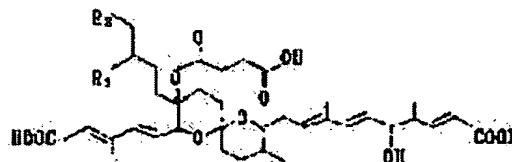
(54) THERAPEUTIC AGENT FOR BONE DISEASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a therapeutic agent for bone diseases, containing a liblomycin as the active component and having an excellent osteogenesis promotion effect and an excellent bone resorption inhibitory effect.

CONSTITUTION: A compound represented by the formula (R1 and R2 are H or an alkyl) or its salt is contained as the active component. The compound of the formula has a remarkable differentiation and calcification promotion effect on osteoblast and a remarkable differentiation effect and a maturation inhibitory effect on osteoclast.

This medicine is effective for therapy of endogenous bone diseases such as reduction of bone weight or exogenous bone diseases such as physical fracture or reduction of therapeutic period and useful for therapy of, e.g. osteoporosis, hypercalcemia, bone Paget's disease, traumatic fracture, fatigue fracture, osteomalacia, nutritional disorder, malignant tumor and weakened osseous tissue or fracture caused by other diseases and for reduction of therapeutic period. This medicine is orally or parenterally administrated in an amount of 10mg to 10g/day per an adult.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 7 - 2 2 3 9 4 5

(43) 公開日 平成 7 年 (1995) 8 月 22 日

(51) Int. Cl. ⁶

A61K 31/35

識別記号

ADD

ABJ

庁内整理番号

C

F I

技術表示箇所

// C07D493/10

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平 6 - 3 7 5 8 6

(22) 出願日 平成 6 年 (1994) 2 月 10 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 6 6 9 9

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 津田 英資

栃木県下都賀郡石橋町石橋 6 2 2 マロニ
エハイツ 2 0 1

(72) 発明者 望月 伸一

栃木県河内郡南河内町薬師寺 2 6 6 3 - 4
グリーンタウン 1 5 0 - 1 - 4

(72) 発明者 高橋 英俊

栃木県河内郡南河内町薬師寺 3 3 0 4 - 1
グリーンタウン 1 8 3 - 1 - 8

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

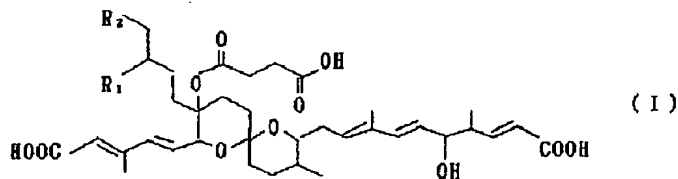
(54) 【発明の名称】 骨疾患治療剤

(57) 【要約】

【化 1】

【構成】 本発明は、一般式 (I)

リペロマイシン



(式中 R¹ 及び R² は水素又はアルキル基を表す。) で表されるリペロマイシン類またはその塩を有効成分として含有することを特徴とする骨疾患治療剤。

【効果】 骨芽細胞に対し顕著な分化及び石灰化促進活

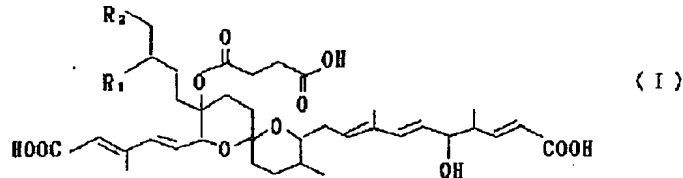
性を有しており、また破骨細胞に対し、顕著な分化・成熟抑制活性を有している。骨粗鬆症、高カルシウム血症等の治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (I) で表されるリペロマイシン類またはその生理的に許され得る塩を有効成分とするリペロマイシン

とを特徴とする骨疾患治療剤。

【化 1】



(式中、R¹ 及び R² は水素又はアルキル基を表す。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は優れた骨形成促進及び骨吸収抑制作用を有する骨疾患治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 骨多孔症や骨粗鬆症等は、骨の石灰質と骨基質とがともに減少することを特徴としている。これらの疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となることが知られており、現在、これらの疾患は高齢人口の増加に伴い社会問題化している。人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しており、これらの疾患は骨組織において、骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより骨組織が脆くなり発生する疾患であると言われている。又、物理的骨折や疲労骨折等は骨折部位の修正を行い、修正後は患者自身の治癒力に任せるといった治療がされているのが現状である。

【0003】 現在これらの骨に関わる疾患の治療剤及び治療期間の短縮を図るものとして臨床では活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体やエストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン、カルシウム製剤等が投与されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、これらを用いた治療法には経口投与を行うことができない、或いは効果の不確実性等の改善されるべき問題があり、これらに代わる新しい治療剤の開発が望まれていた。本発明は新しいリペロマイシン

規な骨疾患治療剤を提供することを課題とする。

【0005】

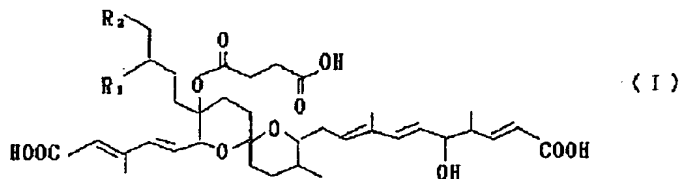
【課題を解決するための手段】 本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意研究の結果、抗腫瘍剤及び抗菌剤として開発されたりペロマイシン類（特開平 4 - 4 9 2 9 6 号及び特開平 5 - 1 9 4 5 2 5 号）のうち、特定の化合物に骨形成促進及び骨吸収抑制作用があることを見出した。本発明は、特定のリペロマイシン類に、(1) 骨芽細胞の分化促進及び分化促進による骨の石灰化促進作用、及び(2) 破骨細胞の分化抑制作用があることを見出し、この化合物を骨疾患治療剤として使用することを可能とした。

【0006】 本発明の骨疾患治療剤は骨芽細胞分化促進、骨芽細胞分化促進による石灰化の促進、及び破骨細胞分化抑制作用を有し、ヒト及び動物に対する骨疾患治療剤として使用される。本発明製剤は骨量減少等の内因性骨疾患及び物理的骨折等の外因性骨疾患の治療及び治療期間の短縮を適用とし、具体的には骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、外傷性骨折、疲労骨折、骨多孔症、骨軟化症、栄養障害、悪性腫瘍、その他疾病が原因による骨組織の脆弱化及び骨折等の治療及び治療期間の短縮に用いられる。

【0007】 本発明で使用されるリペロマイシン類は下記一般式 (I)

【0008】

【化 2】



(式中、R¹ 及び R² は水素又はアルキル基を表す。)

で表される化合物及びその生理学的に許され得る塩よりなる。生理学的に許容される塩として、ナトリウム及びカリウム等のアルカリ金属塩、マグネシウム及びカルシウム等のアルカリ土類金属塩、アルミニウムその他の金属、及びアルキルアミン塩、ピリジン塩等の有機アミン

塩等が挙げられる。

【0009】 一般式 (I) で表されるリペロマイシン類の、側鎖 R¹ 及び R² は水素またはアルキル基を示す。アルキル基としては、特に炭素数 1 ~ 4 のアルキル基が好ましく、このようなアルキル基としてはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル

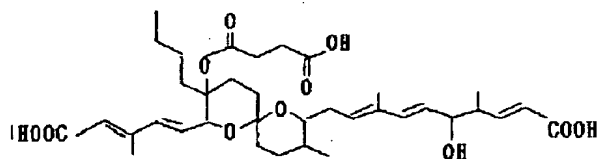
3

基、イソブチル基、三級ブチル基が挙げられる。リベロマイシン類は、一般式 (I) で表される構造中に持つ側鎖 R^1 及び R^2 に入る水素又はアルキル基により、リベロマイシン A、C、D、及びこれらとはスピロ環部分の構造が異なるリベロマイシン B とに分けられる。以下にこれらの構造を示す。

【 0 0 1 0 】

【化 3】

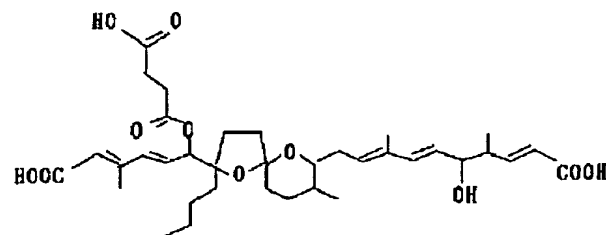
リベロマイシン A



【 0 0 1 1 】

【化 4】

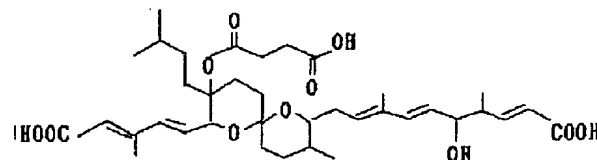
リベロマイシン B



【 0 0 1 2 】

【化 5】

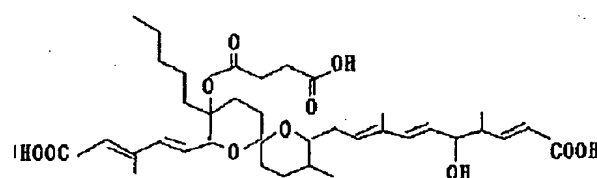
リベロマイシン C



10 【 0 0 1 3 】

【化 6】

リベロマイシン D



【 0 0 1 4 】 本発明において上記一般式 (I) に包含されるリベロマイシン類にリベロマイシン A、C 及び D を挙げるができる。

20

	リベロマイシン		
	A	C	D
R^1	H	CH_3	H
R^2	H	H	CH_3

【 0 0 1 5 】 これらのリベロマイシン類の製造法は公知方法及びそれに準ずる方法、例えば特開平 4 - 4 9 2 9 6 又は特開平 5 - 1 9 4 5 2 5 号公報、及びジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (Journal of Antibiotics ; 45 巻、9 号、1 4 0 9 - 1 4 1 3 頁、1 9 9 2 年発行) に記載されているリベロマイシン類生産菌を培養する方法により製造することができる。

【 0 0 1 6 】 本発明で用いられる骨疾患治療剤は、ヒト及び動物に対し、医薬として経口的及び非経口的に安全に投与される。非経口的投与には、例えば静脈注射、筋肉内注射、皮下注射、腹腔内注射、経皮投与、経肺投与、経鼻投与、経腸投与、口腔内投与、経粘膜投与等が挙げられ、これらの製剤が投与される。例えば注射剤、坐剤、エアゾール剤、経皮吸収テープなどが挙げられる。又、経口投与製剤として例えば錠剤 (糖衣錠、コー

ティング錠、バッカル錠を含む)、散剤、カプセル剤 (ソフトカプセルを含む)、顆粒剤 (コーティングした物も含む)、丸剤、トロリー剤、液剤、又はこれらの製剤学的に許容され得る徐放化製剤等が挙げられる。経口投与用液剤には懸濁剤、乳剤、シロップ剤 (ドライシロップを含む)、エリキシル剤などが挙げられる。これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理的に許容され得る担体、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤等と共に医薬組成物として投与される。これらの製剤に用いる担体や賦形剤としては、例えば乳糖、ブドウ糖、白糖、マンニトール、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、結晶セルロース、カンゾウ末、ゲンチアナ末など、結合剤としては例えばデンプン、トラガントゴム、ゼラチン、シロップ、ポリビニルアルコール、ポリ

50

ビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなど、崩壊剤としては例えばデンプン、寒天、ゼラチン末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど、滑沢剤としては例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴールなど、着色剤としては医薬品に添加することが許容されているものを、それぞれ用いることができる。錠剤、顆粒剤は必要に応じ白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、精製セラック、ゼラチン、グリセリン、ソルビトール、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、フタル酸セルロースアセテート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルメタクリレート、メタアクリル酸重合体などで被膜しても良いし、2以上の層で被膜しても良い。さらにエチルセルロースやゼラチンのような物質のカプセルでも良い。又、注射剤を調製する場合は、主薬に必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加して、常法により各注射剤とする。

【0017】本発明の骨疾患治療剤を患者に投与する場合、症状の程度、患者の年齢、健康状態、体重などの条件によって異なり特に限定はされないが、成人1日当たり約10mg～10gを経口或いは非経口的に1日1回若しくはそれ以上投与すれば良い。

【0018】本発明の薬剤の毒性は非常に低く、例えば本薬剤100mg/kg体重を4週齢（体重100～120g）のWistar系雄ラットに静脈注射した場合、9日間投与しても毒性を示さず、非常に安全な薬剤である。

【0019】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0020】製造例1：リペロマイシン類の製造方法
ストレプトミセス属に属する放線菌SN-593株（微工研菌寄第11503号）をグルコース2%、可溶性デンプン1%、肉エキス0.1%、乾燥酵母0.4%、大豆粉2.5%、食塩0.2%の組成からなる培地に接種し、前培養液とした。この前培養液1.5リットルを同組成の培地120リットルを含む200リットル容タンクに接種し、27℃で117時間にわたり通気攪拌培養した。この全培養液の濾液約100リットルを18.5リットル容量のダイヤイオンHP20に吸着させ、約36リットルの30%メタノールで不純物を溶出させた後、36リットルの100%メタノールで活性成分を溶出させた。活性成分を含むフラクションを減圧濃縮した後、2リットルの酸性水（1N塩酸でpH3に調整）を加

え、等量の酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル層を減圧濃縮して得られた残渣を少量のクロロホルム：メタノール混合液（2：1）に溶解し、2.2リットル容量のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。4.5リットルのクロロホルム：メタノール混合液（2：1）で洗浄した後、4.5リットルの100%メタノールで溶出して活性画分を得た。さらに活性画分を減圧濃縮した後、残渣を少量の20%メタノールに溶解して1リットル容量のセファデックスLH-20カラムに付し、1.5リットルの20%メタノールで展開して活性画分を回収した。活性画分を減圧濃縮した後に凍結乾燥し、リペロマイシンA、リペロマイシンB、リペロマイシンC、及びリペロマイシンDを含む粗精製物約8gを得た。

【0021】この粗精製物を高速液体クロマトグラフィー（カラム：CAPCELL PAK C₁₈、100mmφ×500mm、検出：UV240nm）に付し、メタノール：水：1%アンモニア水（18：81：1）の混合溶媒を用いて、流速220ml/分で展開してリペロマイシンA、リペロマイシンB、リペロマイシンC、及びリペロマイシンDをそれぞれ単一の成分として含むフラクションを回収した。各フラクションを減圧濃縮し、残った水溶液を1N塩酸でpH3に調整した後、等量の酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル層を減圧濃縮して得られた残渣を凍結乾燥し、約3gのリペロマイシンA、約12mgのリペロマイシンB、約80mgのリペロマイシンC、及び約14mgのリペロマイシンDを得た。

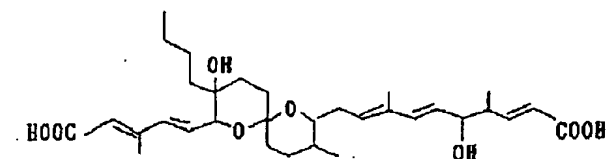
【0022】脱スクシニル-リペロマイシンAの製造方法

得られたリペロマイシンAを0.5N水酸化カリウム溶液中で室温にて1時間以上反応させる。この反応液を1N塩酸でpH3に調整した後酢酸エチルで抽出し、抽出液を濃縮乾固して目的の脱スクシニル-リペロマイシンAが得られた。以下に脱スクシニル-リペロマイシンAの構造式を示す。本化合物は以下に示す実験により、骨疾患治療効果がないことが確認された。本発明においてはリペロマイシン類の骨疾患治療効果を確認する際の対照として用いた。

【0023】

【化7】

脱スクシニルリペロマイシンA



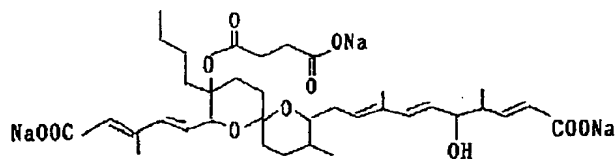
【0024】リペロマイシンAナトリウムの製造方法
得られたリペロマイシンAを蒸留水に懸濁させ、これに1N水酸化ナトリウム溶液を滴下し、pH7～7.5に調

整し、0.45 μ m孔径のメンブレンフィルターによる濾過を行い、凍結乾燥して目的とするリベロマイシンAナトリウムが得られた。以下にリベロマイシンAナトリウムの構造式を示す。本化合物は本発明において注射剤としてリベロマイシン類を投与するための化合物として用いた。

【0025】

【化8】

リベロマイシンAナトリウム



【0026】

製造例2：錠剤の製造

リベロマイシンA	10 g
馬鈴薯澱粉	6 g
ステアリン酸タルク	4 g
6% HPC乳糖	180 g

合計 200 g

各成分を混合し、リベロマイシン25 mgを含む500

製造例4：カプセル剤の製造

リベロマイシンA	5 g
乳糖	40 g
馬鈴薯澱粉	50 g
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	3.5 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

合計 100 g

各成分を良く混和し1号カプセルに充填し、300個製造した。

製造例5：注射剤の製造

リベロマイシンAナトリウム	5 g
生理食塩水	100 ml

合計 5 g / 100 ml

上記のリベロマイシンAナトリウムを生理食塩水に溶解し、バイアルに充填し、加熱殺菌を行って静注用注射剤とした。

【0030】

【発明の効果】以下に本発明の骨疾患に対する効果を示す。

【0031】試験例1：石灰化試験に用いる細胞の調製
in vitroにおける骨形成の試験方法として有用であるラット骨髄間質細胞の石灰化試験 (Cell. Tissue. Res. vol. 254, pp 317-330, 1988; Blood vol. 77, pp 1906-1911, 1991) を行うための試料調製を行った。5又は6週

mgの錠剤400個を製造した。

【0027】

製造例3：顆粒剤の製造

リベロマイシンA	10 g
乳糖	187 g
ステアリン酸マグネシウム	3 g

合計 200 g

各成分を混合した後圧縮成形し、粉碎、整粒して20～50メッシュの5%顆粒剤を製造した。

【0028】

40 齢の雌SD系ラットの大腿骨より骨髓細胞を採取し、15%牛胎児血清、アスコルビン酸 50 μ g/ml、 β -グリセロリン酸 10 mM、デキサメサゾン 10^{-8} M、ペニシリンGナトリウム 100 U/ml、硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml、及びアムホテリシンB 0.25 μ g/mlを含むMEM- α アルファ培地（核酸含有）40 mlに懸濁させ、1匹のラットから得られた細胞毎に75 cm^2 T-フラスコに播種した。このT-フラスコに播種した細胞を5%炭酸ガス、湿度100%、37℃に調整したインキュベーター中で培養した。培養開始2日後に、培養液を新鮮な上記培養基に交換し、更に培養を行

った。培養開始4から6日後、T-フラスコを0.05%のトリプシンで処理し、付着細胞、即ち骨髄間質細胞を得た。骨髄間質細胞を、試験検体を加えた上記培養基に懸濁させ、96穴マイクロウェル又は24穴マイクロウェルに各々 5×10^3 個/ $200 \mu\text{l}$ / 96 ウェル又は 3×10^4 個/ 1ml / 24 ウェル播種した。

【0032】カルシウム沈着試験法

前記試験例1記載の方法に従い、ラット骨髄間質細胞の培養を行い、石灰化の指標である組織カルシウムの沈着を試験した。前記試験例1記載の方法に従い得られた各ウェルのラット骨髄間質細胞を、培養開始1週間後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、中性ホルマリンで一晩室温で固定した。固定後、各ウェルを水洗し、ダールのカルシウム染色(アリザリンレッドS染色)を行った。

各ウェルを再度水洗した後、石灰化組織に沈着した色素を1Mリン酸-エタノール溶液(1:1)で可溶化した。尚、可溶化は96ウェルの場合 $100 \mu\text{l}$ 、24ウェルの場合 1ml のリン酸-エタノール溶液を用いて実施した。可溶化後、405nmの吸光度を測定し、カルシウムの沈着を測定した。

【0033】カルシウム沈着試験 I

上記の96ウェルを用いた試験法に従い、リペロマイシン類を添加した培地中で骨髄間質細胞を培養しカルシウム沈着試験を行い、その結果を表1に示した。尚、カルシウム沈着試験の結果は、405nmの吸光度のコントロール値に対する百分率で示した。

【0034】

【表1】

	サンプル濃度 (M)		
	5.6×10^{-7}	1.7×10^{-6}	5.1×10^{-6}
無添加(Control)	100 \pm 10		
リペロマイシンA	92 \pm 0	119 \pm 2	138 \pm 10
リペロマイシンB	103 \pm 22	72 \pm 2	36 \pm 7
リペロマイシンC	105 \pm 11	122 \pm 3	27 \pm 6
脱スクシニル-リペロマイシン A	93 \pm 2	86 \pm 4	84 \pm 3

(数値は平均値 \pm 標準偏差 (n=3))

【0035】上記表1より、 1.7×10^{-6} 及び 5.1×10^{-6} MのリペロマイシンA及び 1.7×10^{-6} MのリペロマイシンCにより、石灰化組織への顕著なカルシウム沈着の促進が観察された。又、リペロマイシンB及び脱スクシニル-リペロマイシンAによるカルシウム沈着の促進は観察されなかった。以上の結果から、その部分構造に、六-六員環スピロケタールとコハク酸部分を有するリペロマイシン類に明確な石灰化促進活性が存在することが明らかになった。

【0036】試験例2：カルシウム沈着試験 II

上記の24ウェルを用いた試験法に従い、石灰化促進活性が観察されたリペロマイシンAを添加した培地中で骨髄間質細胞を5-10日間培養しカルシウム沈着試験を行い、その結果を図1に示した。尚、カルシウム沈着試験の結果は405nmの吸光度で示した。

【0037】図1より、 10^{-6} MのリペロマイシンAはデキサメサゾンによる石灰化(カルシウム沈着)速度を増し、さらに最大カルシウム沈着量を増大させることが明らかになった。この結果からも、特定の構造を有するリペロマイシン類に明確な石灰化促進活性が存在することが明らかになった。

【0038】試験例3：アルカリフォスファターゼ(ALP)活性測定

前記試験例1に従いラット骨髄間質細胞の培養を行い、

骨芽細胞の分化の指標となることが知られている組織アルカリフォスファターゼ活性(組織培養、15巻、155-159頁、1989年発行、及びBlood Vol.77, pp 1906-1911(1991))を試験した。

【0039】前記試験例1記載の方法に従い得た各ウェルのラット骨髄間質細胞を、培養開始一定期間後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、中性ホルマリンで一晩4℃で固定した。固定後、各ウェルを水洗し、アゾ色素法に従い、2分30秒間アルカリフォスファターゼ染色を行った。尚、アゾ染色の基質としては、ナフトールAS-BIリン酸2ナトリウム塩を用い、ジアゾニウム塩としてはファーストブルーRR塩を用い試験を行った。各ウェルを再度水洗した後、培養組織に沈着した色素をジメチルスルホキシド $500 \mu\text{l}$ で可溶化した。可溶化後、470nmの吸光度を測定し、組織アルカリフォスファターゼ活性を測定した。尚、このアルカリフォスファターゼ活性試験は24ウェルを用いて実施した。

【0040】アルカリフォスファターゼ活性試験 I

上記の24ウェルを用いた試験法に従い、リペロマイシンAを添加した培地中で骨髄間質細胞を1週間培養し、組織アルカリフォスファターゼ活性を試験した。尚、この試験は 10^{-6} Mのデキサメサゾン存在下及び非存在下で実施し、その結果を表2に示した。アルカリフォスファターゼ活性試験の結果は、470nmの吸光度のデキサメサゾン存在下及び非存在下でのコントロール値に対する

百分率で示した。

【 0 0 4 1 】

【表 2】

	リベロマイシンA濃度 (M)		
	Control	10^{-6}	2×10^{-6}
10^{-8} M デキサメサゾン	100 ± 1	114 ± 1	121 ± 3
	*(140 ± 1)		
(-) デキサメサゾン	100 ± 3	121 ± 0	145 ± 7

(数値は平均値±標準偏差 (n=3))

(*はデキサメサゾン非存在下でのコントロール値に対する、 10^{-8} Mデキサメサゾン存在下でのコントロール値の百分率値)

【 0 0 4 2 】 上記表 2 より、 10^{-6} 及び 2×10^{-6} のリベロマイシンAにより、デキサメサゾン存在下及び非存在下で、組織での顕著なアルカリフォスファターゼ活性の上昇が観察された。既に述べたように、アルカリフォスファターゼ活性の上昇は一般に骨芽細胞の分化の指標と考えられている。従って、上記の結果から、特定の構造を有するリベロマイシン類の石灰化促進活性は骨芽細胞の分化の促進により引き起こされていることが明らかになった。また前記試験例 2 に示したリベロマイシンAによる石灰化の速さを増す作用もこの結果より明らかである。

かである。

【 0 0 4 3 】 試験例 4 : アルカリフォスファターゼ活性試験 II

上記の 24 ウェルを用いた試験法に従い、リベロマイシンAを添加した培地中で骨髄間質細胞を一定期間培養し、組織アルカリフォスファターゼ活性を試験した。尚、この試験は 10^{-8} M のデキサメサゾン存在下及び非存在下で実施し、その結果を表 3 に示した。アルカリフォスファターゼ活性試験の結果は、470nmの吸光度のデキサメサゾン存在下及び非存在下でのコントロール値に対する百分率で示した。

【 0 0 4 4 】

【表 3】

培養 期間	リベロマイシンA濃度 (M)		
	Control	10^{-6}	2×10^{-6}
6 日	100 ± 4	131 ± 7	123 ± 4
7 日 10^{-8} M デキサメサゾン	100 ± 3	129 ± 8	155 ± 6
8 日	100 ± 4	116 ± 2	166 ± 2
6 日	100 ± 4	123 ± 3	143 ± 2
7 日 (-) デキサメサゾン	100 ± 6	105 ± 9	142 ± 5
8 日	100 ± 5	103 ± 3	120 ± 6

(数値は平均値±標準偏差 (n=3))

【 0 0 4 5 】 上記表 3 より、各培養期間において、 10^{-6} 及び 2×10^{-6} M のリベロマイシンAにより、組織での顕著なアルカリフォスファターゼ活性の上昇が観察された。従って、上記の結果から、特定の構造を有するリベロマイシン類の石灰化促進活性は骨芽細胞の分化の促進により引き起こされていることが明らかになった。

【 0 0 4 6 】 試験例 5 : 破骨細胞形成試験

骨吸収の抑制を評価する in vitro 試験法として有用であるラット骨髄細胞からの破骨細胞形成試験法 (蛋白質核酸 酵素 Vol. 34, pp 999-1005 (1989) 及び Endocrinology Vol. 122, pp 1373-1382 (1988)) を用い、リベロ

マイシン類の活性を試験した。

【 0 0 4 7 】 16 日齢のメス SD ラットの大腿骨より骨髄細胞を採取し、10%牛胎児血清、 10^{-8} M 活性型ビタミンD₃ (カルシフェロール)、100 U/ml ベニシリンGナトリウム塩、100 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン、及び 0.25 µg/ml アンフォテリシンB (ファンギゾン) を含む MEM-アルファ培地 (核酸不含) に懸濁させ、24穴マイクロウェルに 7.5×10^5 個/0.5ml/24ウェル播種した。培養開始3日後及び5日後に、各ウェルの培養液を試験検体を含む新鮮な培養液に交換した。培養開始1週間後、各ウェルをリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、エタノール-アセトン

13

溶液 (1 : 1) を用い、室温で 1 分間固定した。固定終了後、固定液を捨て、室温で乾燥させた。乾燥後、白血球酸性フォスファターゼキット (シグマ社製) を用い各ウェルの細胞の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色を行った。染色後、倒立顕微鏡を用い、赤橙色に染色された細胞を破骨細胞として計数した。

【0048】破骨細胞形成試験 I

		サンプル濃度 (M)		
		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
無添加 (Control)	100 ± 21			
リベロマイシン A		26 ± 5	16 ± 5	8 ± 3
リベロマイシン C		84 ± 26	39 ± 13	13 ± 3
脱スクシニル-リベロマイシン A		105 ± 26	105 ± 23	100 ± 18

(数値は平均値 ± 標準偏差 (n=3))

【0050】上記表 4 より 10^{-8} 、 10^{-7} 及び 10^{-6} M リベロマイシン A と 10^{-7} 及び 10^{-6} M リベロマイシン C により、濃度に依存して顕著な破骨細胞形成の抑制が観察された。脱スクシニル-リベロマイシン A による破骨細胞形成の抑制は観察されなかった。以上の結果から、その部分構造にコハク酸部分を有する特定のリベロマイシン類に明確な破骨細胞形成抑制活性が存在することが明らかになった。

		サンプル濃度 (M)	
		6.3×10^{-7}	10^{-6}
無添加 (Control)	100 ± 30		
リベロマイシン A		9 ± 2	4 ± 2
ビタミン K ₁		98 ± 47	11 ± 2

(数値は平均値 ± 標準偏差 (n=3))

【0053】上記表 5 より、 6.3×10^{-7} 及び 10^{-6} M のリベロマイシン A により、リベロマイシン濃度に依存した顕著な破骨細胞形成の抑制が再現された。また、その抑制活性はビタミン K₁ と比較して、より低濃度で強い活性が観察された。以上の結果から、特定の構造を有するリベロマイシン類に強い破骨細胞形成抑制活性が存在することが明らかになった。

【0054】以上の結果より、本発明のリベロマイシン

14

上記試験法に従い、リベロマイシン類を添加した培地中で骨髄細胞を培養し破骨細胞形成試験を行い、結果を表 4 に示した。尚、破骨細胞形成試験の結果は、形成された破骨細胞数のコントロール値に対する百分率で示した。

【0049】

【表 4】

【0051】試験例 6 : 破骨細胞形成試験 II

上記試験法に従い、リベロマイシン A を添加した培地中で骨髄細胞を培養し、又破骨細胞形成を抑制することが知られているビタミン K₁ を対照品として供し、破骨細胞形成試験を行い、結果を表 5 に示した。尚、破骨細胞形成試験の結果は、形成された破骨細胞数のコントロール値に対する百分率で示した。

【0052】

【表 5】

類は骨疾患治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

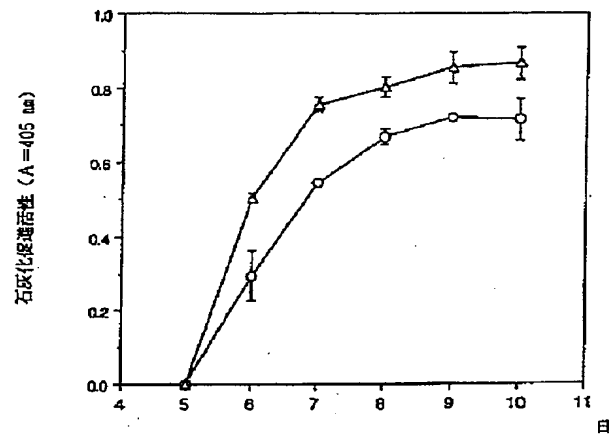
【図 1】試験例 2 のリベロマイシン A による骨髄間質細胞の石灰化促進活性の経時変化を表す。

【符号の説明】

○ ; 10^{-8} M デキサメザゾン

△ ; 10^{-8} M デキサメザゾン + 10^{-6} M リベロマイシン A

【図 1】



フロントページの続き

(72)発明者 東尾 侃二

埼玉県川越市山田 1 7 6 9 - 1 0

(72)発明者 井瀬 正司

栃木県下都賀郡石橋町石橋 8 0 9 - 3

(72)発明者 吉浜 誠

栃木県宇都宮市江曾島町 1 4 0 0 - 8